



Realtime PCR Master Mix

(Code No. QPK-101, QPK-101T)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

【目次】

[1]	はじめに・・・・・・・・・・・・・・・・	(2)
[2]	ご使用にあたっての留意点・・・・・・・・	(2)
[3]	本品に含まれるもの・・・・・・・・	(3)
[4]	ご用意いただくもの・・・・・・・・	(3)
[5]	プロトコル・・・・・・・・	(4)
1.	ABI PRISM®7700を用いたTaqMan®アッセイ・・・・・・・・	(4)
2.	Roche LightCycler™を用いたハイブリダイゼーションブ ローブアッセイ・・・・・・・・	(5)
3.	BioFlux LineGeneを用いたTaqMan®アッセイ・・・・・・・・	(6)
4.	逆転写酵素添加による1ステップ RT-PCR・・・・・・・・	(7)
[6]	トラブルシューティング・・・・・・・・	(9)
[7]	関連商品・・・・・・・・	(10)

【ご注意】

本製品は研究用試薬です。診断・臨床用試薬として決して使用しないで下さい。本製品の使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意して下さい。

本製品は、F. Hoffmann-La Roche Ltd.、Roche Molecular Systems Inc.並びにThe Perkin-Elmer Corporationとのライセンス契約に基づき販売されるものです。

"Purchase of this product is accompanied by a limited license to use it in the Polymerase Chain Reaction (PCR) process for The Research Field in conjunction with a thermal cycler whose use in the automated performance of the PCR process is covered by the up-front license fee, either by payment to Perkin-Elmer or as purchased, i.e., an authorized thermal cycler."

※LightCycler™は、Idaho Technology Inc.並びにRoche Molecular Systems Inc.の商標です。

※TaqMan®は、Roche Molecular Systems Inc.の登録商標です。

※ABI PRISM®は、The Perkin-Elmer Corporationの登録商標です。

[1] はじめに

1. 本品の概要

本製品は、プライマーとサンプルDNA以外の全ての組成を含む2×マスターミックスです。各種プローブやプライマーを組み合わせ、TaqMan[®]アッセイ法やハイブリダイゼーションプローブアッセイ法などによるリアルタイム定量PCRを実施できます。勿論、通常のPCRにご使用いただくことも可能です。

2. 本品の特長

・高い汎用性

本製品は、ロシュ・ダイアグノスティックス社のLightCycler[™]など、ガラスキャピラリーを使用するシステムに対応するため、BSAを含有しています。一方、アプライドバイオシステムズ社のABI PRISM[®]7700などに対応したパッシブリファレンスも添加しています。このパッシブリファレンスは、LightCycler[™]など、これを利用しないシステムでの使用に影響がないことを確認しております。勿論、バイオフラックス社のLineGeneでもご使用いただけます。

・高速なホットスタートが可能

本製品は、非特異反応を抑えるため、Taq DNAポリメラーゼに抗Taqモノクローナル抗体を使用したホットスタートPCRを採用しております。その結果、極めて速やかな再活性化が可能になりました。従来は、ポリメラーゼの再活性化のために10分以上を要していた最初の変性工程が1分以内で完了、各サイクルの変性ステップも核酸の変性に必要な時間だけを考慮して設定いただけます。LightCycler[™]など高速なPCR装置では、その時間短縮メリットをよりいっそう生かすことができます。

[2] ご使用にあたっての留意点

1. ご使用についての注意事項

- ・本製品は研究用試薬です。診断・臨床用試薬として使用しないで下さい。また、本試薬に関する有害性の調査は十分ではありません。保護具を着用するなど、取扱いには十分ご注意下さい。
- ・融解直後は、緩やかに転倒混和して、十分に均質化して下さい。

2. 保存について

本製品は、原則として-20℃以下で遮光して凍結保存します。ただし、融解後は2ヶ月程度を限度として4℃で保存して下さい。この場合も遮光する必要がありますので、遮光できる箱か、添付のアルミ袋で保存して下さい(QPK-101には、包装以外にもう1枚アルミ袋を添付しておりますので、-20℃と4℃でお使い分け下さい)。1本ずつ融解し、4℃保存で2ヶ月以内にご使用されることをお勧めします。やむを得ず融解したチューブを長期間(数ヶ月単位)使用しない場合は、-20℃で再凍結して下さい。

尚、当社内での検討では、4℃で80日程度保管しても、特に品質上の劣化が認められませんでした。また、20回凍結融解を繰り返しても使用可能でした。

[3] 本品に含まれるもの

[Realtime PCR Master Mix]

dNTP、MgCl₂、Taq DNAポリメラーゼや抗Taqモノクローナル抗体など、PCR反応組成を含む溶液です。濃度は必要濃度の2倍になっています。

[4] ご用意いただくもの

1. 本品の他に必要な試薬・機材

[プライマー・プローブ]

検出・定量したい遺伝子配列に対応したプライマーペアやプローブをご用意下さい。プライマー・プローブの設定は、各アッセイ系に特有の注意事項に従って実施して下さい。一般的に増幅領域の長さも重要です。傾向として、増幅領域が長いほど非特異反応が起こりやすく、増幅効率も低下するので、増幅領域は200bp以下、できれば150bp以下が望ましいです。

[蒸留水]

一般のPCRなどに使用可能な純度の水をご使用下さい。

[リアルタイムPCR装置]

アプライドバイオシステムズ社のABI PRISM[®]7700、ロシュ・ダイアグノスティクス社のLightCycler[™]、バイオフラックス社のLineGeneなどのリアルタイムPCR装置をご使用下さい。ご使用にあたっては各装置の取扱説明書に従って下さい。

2. サンプルDNA

[cDNA]

- 1st strand cDNA合成反応後、フェノール処理・エタノール沈殿などで精製したサンプルをご使用下さい。1st strand cDNA合成時のプライマーは、ランダムプライマー、オリゴdTプライマーのどちらであってもいいですが、PCR反応への持ち込み量にご注意下さい。
- 当社の1st strand cDNA合成キット「ReverTra Ace - α -[®]」(Code:FSK-101)の反応液であれば、10倍以上に希釈して、そのままご使用いただけます。原液でも増幅は致しますが、cDNA合成時のプライマーや(熱処理しても)逆転写酵素の混入がPCRの定量性に影響する場合があります。希釈してご使用することをお勧めします。

[ゲノムDNAなど]

通常のPCRに使用可能な精製度のDNAサンプルをご使用下さい。ヒトのゲノムDNAなどでは、1～10ng程度が適当です。

[5] プロトコール

1. ABI PRISM®7700を用いたTaqMan®アッセイ

(1)反応液の調製

[PCR反応液(例)](プライマー 0.4 μM、プローブ 0.2 μM、スケール 50 μL)

蒸留水	14 μL
Realtime PCR Master Mix	25 μL
プライマー 1 (10 μM)	2 μL
プライマー 2 (10 μM)	2 μL
TaqMan®プローブ (5 μM)	2 μL
サンプル溶液	5 μL
合計液量	50 μL

- Realtime PCR Master Mixが合計液量の1/2であれば、その他の組成は最適な条件にご変更いただいて結構です。また、合計液量(反応スケール)を変更する場合は、最適条件の比率を維持して下さい。
- プライマーは最終0.2~1 μMの範囲内でご検討下さい。プローブは最終0.05~0.3 μMの範囲内でご検討下さい。増幅効率がよくない場合、プライマーの増量などにより改善する場合があります。
- 既製品のプライマー・プローブミックスを使用される場合は、それが指定する濃度でお使い下さい。SNPsタイピングの試薬もご使用いただけます。
- 実際の調製では、必要本数分+αについて、サンプル溶液以外を含むプレミックス溶液を調製し、所定量をチューブに分注後、最後に、各々のチューブに、サンプル溶液を添加して下さい。

(2)PCRの実施

- 以下のサイクルは一例です。アニール／伸長温度は、プライマー・プローブに合わせて調節して下さい。既製品のプライマー・プローブミックスをお使いの場合は、それが指示する条件を中心にご検討下さい。
- 本品はポリメラーゼの再活性化が極めて短時間で完了しますので、最初の変性時間は60秒、各サイクルの変性時間も15秒でPCRは可能です。初期変性時間は大抵の場合、1分程度で十分です。必要以上の加熱は、酵素活性を低下させて結果に影響を及ぼす可能性がありますので、特に5分以上の変性は避けて下さい。
- リアルタイムPCRは一般的に長鎖の増幅を行なわないので、伸長時間の調節は不要ですが、変更する場合、data collectionのステップは30秒以上確保する必要があります。
- 設定の詳細は装置の取扱説明書をご参照下さい。

[PCRサイクル(例)](2ステップ、アニール／伸長 60°C)

95°C 60秒	
↓	
95°C 15秒	} ×40サイクル
60°C 60秒(data collection)	

2. Roche LightCycler™を用いたハイブリダイゼーションプローブアッセイ

(1)反応液の調製

[PCR反応液(例)](プライマー 0.3 μM、プローブ 0.2/0.4 μM、スケール 20 μL)

蒸留水	5.6 μL
Realtime PCR Master Mix	10 μL
プライマー 1 (10 μM)	0.6 μL
プライマー 2 (10 μM)	0.6 μL
ハイブリプローブ 1(5'acceptor) (10 μM)	0.8 μL
ハイブリプローブ 2(3'donor) (10 μM)	0.4 μL
サンプル溶液	2 μL
合計液量	20 μL

- ・ハイブリダイゼーションプローブアッセイは、2種類のプローブ間で蛍光エネルギー転移(FRET)を発生させて検出する手法です。プローブ1の5'末端にはアクセプター蛍光色素(LC-Red640など)、プローブ2の3'末端にはドナー蛍光色素(FITCなど)が結合されています。
- ・Realtime PCR Master Mixが合計液量の1/2であれば、その他の組成は最適な条件にご変更いただいて結構ですが、一般的にプローブ1をプローブ2よりも多くします。また、合計液量(反応スケール)を変更する場合は、最適条件の比率を維持して下さい。
- ・増幅効率が悪い場合、プライマーの増量などにより、改善する場合があります。
- ・実際の調製では、必要本数分+αについて、サンプル溶液以外を含むプレミックス溶液を調製し、所定量をキャピラリーに分注後、最後に、各々のキャピラリーに、サンプル溶液を添加して下さい。

(2)PCRの実施

- ・アニーリングステップは、プローブのT_m値よりも低く設定します。プローブが結合しますので、dataはこのステップで収集して下さい。
- ・伸長温度は、プローブのT_m値よりも高くします。プローブが外れ、伸長が進行します。これらの温度は各プライマー・プローブに合わせて設定して下さい。
- ・本品はポリメラーゼの再活性化が極めて短時間で完了しますので、最初の変性時間は30秒、各サイクルの変性時間も5秒設定でPCRは可能です。初期変性時間は大抵の場合、1分程度で十分です。必要以上の加熱は、酵素活性を低下させて結果に影響を及ぼす可能性がありますので、特に5分以上の変性は避けて下さい。
- ・設定の詳細は装置の取扱説明書をご参照下さい。

[PCRサイクル(例)](アニール 50°C 15秒／伸長 75°C 30秒)

95°C 30秒



95°C 5秒

50°C 15秒(data collection)

75°C 30秒

} ×40サイクル

3. BioFlux LineGeneを用いたTaqMan[®]アッセイ

(1)反応液の調製

[PCR反応液(例)](プライマー 0.4 μ M、プローブ 0.2 μ M、スケール 10 μ L)

蒸留水	1.8 μ L
Realtime PCR Master Mix	5 μ L
プライマー 1 (10 μ M)	0.4 μ L
プライマー 2 (10 μ M)	0.4 μ L
TaqMan [®] プローブ (5 μ M)	0.4 μ L
サンプル溶液	2 μ L
合計液量	10 μ L

- Realtime PCR Master Mixが合計液量の1/2であれば、その他の組成は最適な条件にご変更いただいて結構です。また、合計液量(反応スケール)を変更する場合は、最適条件の比率を維持して下さい。
- プライマーは最終0.2~1 μ Mの範囲内でご検討下さい。プローブは最終0.05~0.3 μ Mの範囲内でご検討下さい。増幅効率がよくない場合、プライマーの増量などにより改善する場合があります。
- 既製品のプライマー・プローブミックスを使用される場合は、それが指定する濃度でお使い下さい。SNPsタイピングの試薬もご使用いただけます。
- 実際の調製では、必要本数分+ α について、サンプル溶液以外を含むプレミックス溶液を調製し、所定量をチューブに分注後、最後に、各々のチューブに、サンプル溶液を添加して下さい。

(2)PCRの実施

- 以下のサイクルは一例です。アニール／伸長温度は、プライマー・プローブに合わせて調節して下さい。既製品のプライマー・プローブミックスをお使いの場合は、それが指示する条件を中心にご検討下さい。
- 本品はポリメラーゼの再活性化が極めて短時間で完了しますので、最初の変性時間は60秒、各サイクルの変性時間も15秒でPCRは可能です。初期変性時間は大抵の場合、1分程度で十分です。必要以上の加熱は、酵素活性を低下させて結果に影響を及ぼす可能性がありますので、特に5分以上の変性は避けて下さい。
- リアルタイムPCRは一般的に長鎖の増幅を行なわないので、伸長時間の調節は不要です。
- 設定の詳細は装置の取扱説明書をご参照下さい。

[PCRサイクル(例)](3ステップ、アニール 60°C／伸長 72°C)

95°C	60秒	
↓		
95°C	15秒	} ×40サイクル
60°C	15秒	
72°C	30秒(data collection)	

4. 逆転写酵素添加による1ステップ RT-PCR

(1)概要

- 本試薬は、cDNAやゲノムDNAなどDNAサンプルをターゲットとしたPCR試薬ですが、逆転写酵素を加えることにより、RNAサンプルで1ステップ RT-PCRを実施することができます。
- 当社では、TaqMan[®]アッセイでの検出を確認しました。ただし、1ステップ RT-PCRは通常のPCRよりも非特異反応が発生しやすく、感度が低下する場合がありますをご理解の上、ご検討下さい。また、他のアッセイ系での検証は実施しておりません。
- 本プロトコールは、当社の逆転写酵素「ReverTra Ace[®]」(Code:TRT-101,102)を用いた場合です。他社製逆転写酵素では最適条件が異なる場合がございます。

(2)反応液の調製

- 通常のPCR反応液組成に、「RNase Inhibitor」(Code:SIN-101,102) 0.5U/μL、ReverTra Ace[®] 0.01~1U/μL(いずれも最終濃度)を添加します。その他の組成に変更はありません。また、増幅効率がよくない場合には、1U/μL までを目安にReverTra Ace[®] の濃度を上げて、お試下さい。
- ReverTra Ace[®]はそのままでは使いにくいので、希釈してご使用されることをお勧めします。RNase Inhibitorを蒸留水にて5U/μLに希釈し、これを希釈用液とします。これでReverTra Ace[®]の希釈液を作製します。RT希釈液は用時調製とし、余ったRT希釈液は廃棄して下さい。
- ゲノムDNAの混入など、DNAからの増幅をチェックする目的で、RT(-)コントロール(逆転写酵素を含まない反応液)をとられることをお勧めします。

[RT希釈液(例)](ReverTra Ace[®] 3U/μL (最終0.3U/μL))

RT希釈用液 (RNase Inhibitor 5U/μL)	32 μL
ReverTra Ace [®] (100U/μL)	1 μL
合計液量	33 μL

[PCR反応液(例: TaqMan[®]アッセイ)]

蒸留水	9 μL
Realtime PCR Master Mix	25 μL
プライマー 1 (10 μM)	2 μL
プライマー 2 (10 μM)	2 μL
TaqMan [®] プローブ (5 μM)	2 μL
RT希釈液 (ReverTra Ace [®] 3U/μL)	5 μL
サンプル溶液	5 μL
合計液量	50 μL

- Realtime PCR Master Mixが合計液量の1/2であれば、その他の組成は最適な条件にご変更いただいても結構です。また、合計液量(反応スケール)を変更する場合は、最適条件の比率を維持して下さい。
- プライマーやプローブの濃度は、プロトコール1などを参照してご検討下さい。増幅効率がよくない場合、プライマーの増量などにより改善する場合があります。

- ・既製品のプライマー・プローブミックスを使用される場合は、それが指定する濃度でお使い下さい。
- ・実際の調製では、必要本数分+ α について、サンプル溶液以外を含むプレミックス溶液を調製し、所定量をチューブに分注後、最後に、各々のチューブに、サンプル溶液を添加して下さい。

(3)PCRの実施

- ・基本的に、通常のPCRサイクル(プロトコール1、2および3を参照)の最初に42°C 20分程度の逆転写反応工程を付与し、変性工程を5分程度に延長すること(逆転写酵素を完全に失活させ、PCR阻害を防ぐ)が必要です。その後は、プロトコール1、2および3を参照して、通常のサイクルを実施して下さい。
- ・以下のサイクルは一例です。アニール温度は、プライマーやプローブの T_m などにより調節して下さい。既製品のプライマー・プローブミックスをお使いの場合は、それが指示する条件を中心にご検討下さい。

[ABI PRISM[®]7700(例)]

42°C 20分

↓

95°C 5分

↓

95°C 15秒

60°C 60秒(data collection)

} ×40サイクル

〔6〕トラブルシューティング

1. 増幅曲線がみられない、乱れる

(1) 装置の設定に関する問題(各装置の取扱説明書参照)

原因	対策
ディテクターの設定などが使用したプローブに適合していない	ディテクターの設定を適正化して再解析して下さい。
データコレクトの設定が不適切	設定を適正化して再実験して下さい。
サンプル位置の設定ミス	適正なサンプル位置を設定して再解析、あるいは再実験して下さい。
その他装置の故障・不具合	各装置の取扱説明書に従い、点検して下さい。

(2) 試薬に関する問題

原因	対策
PCRサイクル条件・プライマー・プローブの濃度・配列などが不適切	プライマー・プローブ濃度の変更、サイクル条件の変更により改善する場合があります。これらの検討方法はアッセイ手法により異なりますので、各プロトコルをご参照下さい。これらを検討してもなお不良の場合は、再設計をお勧めします。
サンプルの純度が悪い	フェノール抽出やエタノール沈殿で精製して再実験して下さい。cDNAの場合、逆転写酵素の残留が影響する場合があります。

2. 定量値がばらつく

(1) 装置の設定に関する問題(各装置の取扱説明書参照)

原因	対策
装置の故障・不具合	装置の不具合により、温度管理や検出にばらつきが生じる場合があります。各装置の取扱説明書に従い、点検して下さい。

(2) 試薬に関する問題

原因	対策
サンプルの純度が悪い	不良サンプルは、ばらつきの原因となります。均質なサンプルをご使用下さい。またcDNAの場合、逆転写酵素の残留が影響する場合があります。フェノール抽出やエタノール沈殿で精製して再実験して下さい。

PCRサイクル条件・プライマー・プローブの濃度・配列などが不適切	増幅効率の悪いPCR系は、ばらつきが大きい傾向があります。プライマー・プローブ濃度の変更、サイクル条件の変更をご検討下さい。これらの検討方法はアッセイ手法により異なりますので、各プロトコールをご参照下さい。これらを検討してもなお不良の場合は、再設計をお勧めします。
計量のばらつき	反応スケールを上げて再実験して下さい。

【7】 関連商品

品名	内容	Code No.
ReverTra Ace - α - [®]	100回用	FSK-101
ReverTra Ace [®]	10,000U×1本 50,000U×1本	TRT-101 TRT-102
RNase Inhibitor	2,500U×1本 2,500U×5本	SIN-101 SIN-102
SYBR [®] Green Realtime PCR Master Mix	1mL×1本 1mL×5本	QPK-201T QPK-201

[製造・販売元]



－納期・注文に関するお問い合わせ－

ライフサイエンス事業部（大阪）

〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号

TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833

E-mail : order_lifescience@bio.toyobo.co.jp

ライフサイエンス事業部（東京）

〒103-8530 東京都中央区日本橋小網町 17 番 9 号

TEL 03-3660-4819 FAX 03-3660-4951

E-mail : order_lifescience@bio.toyobo.co.jp

－製品の内容・技術に関するお問い合わせ－

テクニカルライン

TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833

開設時間 9:00～12:00 , 13:00～17:00（土、日、祝を除く）

E-mail : techosk@bio.toyobo.co.jp

[URL] <http://www.toyobo.co.jp/seihin/xr/lifescience.html>